

**A *Drosophila melanogaster* ivarvonal-fejlődésében
szerepet játszó gének azonosítása és vizsgálata**

A Ph.D. értekezés tézisei

Henn László Dániel

Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

SZTE Biológia Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai

Kutatóközpont, Genetikai Intézet

SZTE TTIK

Szeged, 2014

Bevezetés

Az *Drosophila melanogaster* az ivarvonal-fejlődés vizsgálatának elfogadott modellje. Az ivarvonalsejtek az embriogenezis korai szakaszában, anyai hatású faktorok hatására alakulnak ki. Az embrionális ivarvonalsejtek a gasztruláció során a középbél-kezdemény falához kapcsolódva az embrió belsejébe türemkednek, majd aktív mozgással áttörnek a bélkezdemény falán. Ezután vonzó és taszító szignálok hatására a fejlődő embrió testüregében vándorolnak. Az embrionális ivarvonalsejtek vándorlásuk során két csoportra oszlanak, és az embrionális ivarszerv-kezdemények szomatikus prekurzor-sejtjeivel összekapcsolódva az embrionális fejlődés végére kialakítják az ivarszerveket. Az ivarvonal differenciálódása a lárvák, a bábok és a kifejlett állatok ivarszerveiben folytatódik. A kifejlett állatok ivarszerveiben az őssejt jellegű ivarvonalsejtek osztódásával és differenciálódásával keletkeznek az érett peték és hímivarsejtek.

Az embrió poszterior pólusán lefűződő ivarsejtekben a zigosztikus transzkripció sokáig represszált, csak az embrionális gasztruláció idejétől aktiválódik fokozatosan, ettől az időponttól kezdve tehát az anyai eredetű és a zigosztikus kifejeződésű géntermékek együttesen irányítják az ivarvonal-fejlődés lépéseit. Az RNS interferencián alapuló géncsendesítés az embrionális ivarvonal-fejlődés kiváló vizsgálómódszere, hiszen az anyai és zigosztikus eredetű géntermékek (mRNS-ek) egyaránt inaktíválhatók, és így a vizsgálandó gének funkcióvesztéses fenotípusai megfigyelhetők.

Célkitűzések

- A biológiai adatbázisok intenzív fejlődése lehetővé tette, hogy összeállítsuk a *Drosophila* embrionális ivarvonalban specifikusan kifejeződő gének listáját, és ez alapján reverz genetikai kísérletsorozatot tervezzünk. PhD munkám témája az ivarsejt specifikus kifejeződést mutató gének funkcionális genetikai jellemzése RNS interferencia alapú reverz genetikai kísérletsorozattal.
- Az RNS interferencia kísérletsorozatban azonosított gének ivarvonal- fejlődésben betöltött szerepét úgy kívántuk igazolni, hogy a gének mutáns alléljainak hatását az ivarvonal fejlődés szempontjából érzékenyített genetikai háttéren vizsgáltuk.
- Munkánk további részében az RNS interferencián alapuló kísérletsorozat jelölt génjei evolúciós viszonyainak feltárását, és a gének funkciójának felderítését tűztük ki célul.
- Az RNS interferencia kísérletsorozatban azonosított gének ivarvonal-függő szerepét ivarvonal-specifikus géncsendesítési eljárással kívántuk vizsgálni.
- A bemutatott munkában választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az embrionális ivarsejt transzkriptóma funkcionálisan redundáns-e, vagyis, hogy az ivarsejtekben kifejeződő, hasonló szerkezetű fehérjék képesek-e helyettesíteni egymás funkcióját.
- Célul tűztük ki az RNSi kísérletsorozat néhány ígéretes jelölt génjének részletesebb genetikai vizsgálatát.

Alkalmazott módszerek

- Génexpressziós adatbázisok és embrionális ivarszerv cDNS-gyűjtemény alapján azonosítottuk az embrionális ivarvonalban specifikusan kifejeződő géneket.
- Géncsenesítő kettős szálú RNS-eket terveztünk, és szintetizáltunk *in vitro* transzkripció módszerével.
- Az ivarvonal specifikus kifejeződést mutató géneket a gén-specifikus kettős szálú RNS-ek korai *Drosophila* embriókba történő injektálásával csendesítettük. Az injektált embriók ivarvonalsejtjei a nos-Moe-GFP fluoreszcens jelzőfehérjét fejezték ki.
- Az injektált embriók ivarsejtjeinek fejlődését *in vivo* video-mikroszkópia segítségével követtük nyomon. Az azonosított, rendellenes ivarsejt fenotípusokat kategóriákba soroltuk.
- Az embrionális fenotípus-elemzésen átesett állatokat felneveltük, majd a kifejlett állatok ivarszerveit vizsgálva meghatároztuk az ivarsejtfejlődés zavarára utaló csökevényes ivarszerv fenotípus penetranciáját.
- Az RNS interferencia kísérletsorozatban azonosított gének mutáns alléljait érzékenyített genetikai háttéren vizsgáltuk.
- A FlyBase és az Ensemble adatbázisok segítségével feltérképeztük a jelölt gének evolúciós viszonyait és funkcióit.
- Meghatároztuk azokat az ivarvonal-specifikus kifejeződésű géneket, amelyek hasonló fehérjéket kódolnak. A hasonló fehérjéket kódoló géneket páronként, szimultán csendesítettük, hogy megbecsüljük az ivarsejt transzkriptóm funkcionális redundanciájának mértékét.
- Az azonosított gének ivarvonal-függő hatását ivarvonal-specifikus géncsenesítéssel vizsgáltuk. A rendellenes fenotípusokat immun-hisztokémiai módszerekkel, konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk.

- A kiválasztott gének részletes genetikai elemzését szintén immun-hisztokémiai módszerekkel, konfokális mikroszkópia segítségével végeztük.

Eredmények

Génexpressziós adatbázisok és embrionális ivarszerv EST-gyűjtemény vizsgálatával 502 gént azonosítottunk, amelyek mRNS-e ivarvonal-, vagy ivarszerv-specifikus kifejeződést mutat embrionális korban. Ezen 502 génnel géncsendesítő kísérletsorozatot hajtottunk végre, oly módon, hogy a génekre specifikus dsRNS-oldatot olyan korai *Drosophila* embriókba injektáltuk, melyek ivarsejtjei fluoreszcens fehérjét fejeztek ki. A fluoreszcens fehérjét kifejező ivarsejtek sorsát *in vivo* video-mikroszkópia segítségével követtük nyomon az embrionális fejlődés végéig. A videófelvételeket részletesen elemeztük, a géncsendesítések által okozott ivarvonal-fejlődési rendellenességeket fenotípus kategóriákba soroltuk, valamint megállapítottuk a különböző rendellenes fenotípusok előfordulási gyakoriságát. Az embrionális fenotípus analízisen átesett állatokat felneveltük, majd a kifejlett állatok ivarszerveinek állapotát megvizsgálva meghatároztuk a csökevényes ivarszervek penetranciáját. Kísérleteink során 48 olyan gént azonosítottunk, amelyek csendesítése reprodukálható módon embrionális ivarsejt-fejlődési rendellenességeket vagy a kifejlett állatokban csökevényes ivarszervek megjelenését idézte elő.

Géncsendesítő kísérletsorozatunk eredményeinek megerősítéseként a jelölt gének mutáns alléljait érzékenyített genetikai háttéren vizsgáltuk. Ebben a kísérletben a tesztelő *Drosophila* törzs három, az ivarsejt-kialakulásban szerepet játszó gén funkcióvesztéses allélját hordozza heterozigóta formában,

amelyek anyai hatású módon enyhe penetranciájú ivarsejt-hiányos ivarszerv fenotípust idéztek elő kifejlett állatokban. Kimutattuk, hogy a vizsgált gének több mint 70%-ának alléljai jelentős mértékben megemelik az ivarsejt-hiányos fenotípus előfordulásának gyakoriságát az érzékenyített genetikai háttéren.

A géncsendesítő kísérletsorozat jelölt génjeinek evolúciós viszonyait vizsgálva azt találtuk, hogy a gének 72%-a erősen konzervált. Közülük többről kimutatták, hogy az *Drosophila*, vagy más modellszervezet ivarvonalfejlődésben szerepet játszanak. Kísérletsorozatunk egyik legjelentősebb eredményének azt tartjuk, hogy 29 olyan, többségében evolúciósan konzervált gént azonosítottunk, melyeknek funkcióját az ivarsejt-fejlődés folyamatban korábban még nem írták le.

Kísérleteinkben az embrionális ivarsejtben kifejeződő gének mintegy tizedének csendesítése okozott ismételt mutáns fenotípust az ivarvonalfejlődés során. A fenotípussal rendelkező gének alacsony számára magyarázatot adhat a vizsgált gének közötti funkcionális redundancia. Más modellszervezetekben kimutatták, hogy a paralóg és hasonló doménszerkezetű fehérjék képesek funkcionálisan helyettesíteni egymást, így biztosítva a fejlődés robusztusságát. Annak eldöntésére, hogy a *Drosophila* embrionális ivarvonalban milyen mértékű a hasonló fehérjék funkcionális redundanciája, kettős géncsendesítési kísérletsorozatot hajtottunk végre. Hasonló fehérje szekvenciájú, azonos doméneket hordozó fehérjéket kódoló, valamint a paralóg géneket páronként, együttesen csendesítettük. Mindössze egyetlen génpár (*trio* és *Gap1*) esetében tudtunk kimutatni genetikai kölcsönhatást. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy az ivarsejt transzkriptóma funkcionális redundanciája alacsony szintű.

A géncsendesítő kísérletsorozatunk során a célgénekre specifikus kettős szálú RNS-eket korai *Drosophila* embriókba injektáltuk. Mivel az injektált RNS-ek az ivarsejtekben és a testi sejtekben is hatékonyan működnek, nem tudtuk kizárni, hogy a megfigyelt ivarsejt-fenotípusok a testi sejtek hibáinak következményei. Az ivarsejt-függő hatás bizonyítását miRNS útvonalon ható, transzgenikus géncsendesítő short hairpin-RNS-ek (shRNS) ivarvonal specifikus kifejeztetésével végeztük el. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a csendesített gének nagy része, ivarsejt függő módon, de legalábbis ivarsejt függő módon is hozzájárul az ivarvonal-fejlődéséhez. A transzgenikus géncsendesítő shRNS-ek ivarsejt-specifikus kifejeztetésének hatása elsősorban lárvák és kifejlett állatok ivarszerveiben vizsgálható, ezért az eljárás jól kiegészítette az embriókon végzett géncsendesítési kísérletsorozatot, mely főként az embrionális ivarsejtek fejlődési hibáinak kimutatására volt alkalmas.

A pleiotróp hatású gének szerepe az ivarvonal-fejlődésben nehezen vizsgálható. A géncsendesítési eljárás azonban lehetővé teszi olyan, átmeneti erősségű fenotípus kondíciók előállítását, melyekben az ivarsejt hibái megfigyelhetők, azonban a testi sejtek elváltozásai kisebb mértékűek, mint a gén teljes funkcióvesztése esetén. Munkánk során több, testi sejtekben is működő, pleiotróp hatású gén ivarsejt-fejlődésben betöltött szerepét is részletesen megvizsgáltuk. A RhoGEF fehérjét kódoló *pebble* (*pbl*) gén csendesítése az embrionális ivarsejtek számának csökkenését, az ivarsejtek eltévedését, az embrionális ivarszervek összeszerelődésének hibáit, és ezen okok következményeként a gonádok hiányát okozta. Megfigyeltük, hogy a *pbl* mutáns embriókban nemcsak az ivarvonal sejtjei, hanem az embrionális ivarszervek szomatikus komponensei is abnormális elhelyezkedésűek, jelezvén, hogy az embrionális fenotípus legalább részben a testi sejtek hibájának következménye. Ivarvonal-specifikus géncsendesítéssel azonban

kimutattuk, hogy a *pbl* ivarsejt-függő módon is hozzájárul az ivarsejtek fenntartásához. A mikrotubulus kötő fehérjét kódoló *fascetto* (*feo*) gén csendesítése esetén nem figyeltünk meg rendellenességeket az embrionális ivarsejtek fejlődése során. Lárvális ivarszervekben ellenben kevés számú, de rendellenesen nagyméretű ivarsejtet tudtunk kimutatni. Ezt a fenotípust mutáns allélal és ivarvonal specifikus géncsendesítéssel is reprodukáltuk, utóbbi bizonyítja a *feo* ivarsejtfüggő hatását. Vizsgálataink szerint a Feo fehérje az osztódó ivarsejtek telofázisa alatt az osztódási orsó középvonalában lokalizálódik. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *feo* lárvális ivarsejtek osztódásához szükséges.

A *mei-P26* gén TRIM-NHL típusú cink-kötő fehérjét kódol. A génről korábban bizonyították, hogy összetett szerepe van a kifejlett nőtények ivarvonalában, azonban a korábbi egyedfejlődési stádiumokban ivarvonal-specifikus szerepét még nem írták le. Munkánk során azonban kimutattuk, hogy a *mei-P26* az embrionális és lárvális ivarsejt-fejlődés szabályozásában is szerepet játszik. A gén csendesítése az embrionális ivarsejtszám csökkenését eredményezi, mely annak köszönhető, hogy a Mei-P26 hiányában az embrionális ivarsejtek szomatikus irányba differenciálódnak. Kimutattuk továbbá azt is, hogy a *mei-P26* a lárvális ivarszervekben az őssejt jellegű ivarvonalsejtek fennmaradásához is szükséges.

A szumoiláció konzervált poszttranszlációs fehérjemódosító mechanizmus, mely a célfehérjék aktivitását, intracelluláris lokalizációját, stabilitását szabályozza. Géncsendesítő kísérletsorozatunkban a szumoilációs emzimrendszer két tagját, a SUMO-aktivátor alegységet kódoló *Aos1* és a SUMO-ligázt kódoló *Suppressor of variegation 2-10* (*Su(var)2-10*) gént azonosítottuk. Mindkét gén csendesítése csökevényes felnőttkori ivarszervek

kialakulását eredményezte. Ivarvonal-specifikus géncsendesítéssel az említett géneken kívül megvizsgáltuk a SUMO aktivátor enzimkomplex másik tagját kódoló *Uba2*, illetve a SUMO fehérjét kódoló *smt3* gén hiányának hatását. Eredményeink szerint a szumoiláció a hím ivarvonalban a csírvonal összejtek fenntartásához, míg nőstények esetében a csírvonal összejtek fenntartásán túl, azok differenciálódásához is szükséges.

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy géncsendesítésen alapuló reverz genetikai kísérletsorozatot végrehajtva, 48 ivarvonal-fejlődésben szerepet játszó gént azonosítottunk. Feltártuk e gének evolúciós viszonyait, és kimutattuk, hogy a gének csendesítése milyen rendellenességeket okoz az egyedfejlődés különböző stádiumaiban. Bemutattuk, hogy az embrionális ivarsejt transzkriptóm redundanciája alacsony szintű. Részletesebb genetikai vizsgálatok segítségével leírtuk a *pbl*, a *feo* és a *mei-P26* gének, továbbá a szumoiláció ivarvonal-fejlődésben betöltött szerepét.

Közlemények listája

A disszertáció alapját képező közlemény:

Jankovics Ferenc, Henn László, Bujna Ágnes, Vilmos Péter, Spirohn Kerstin, Boutros Michael, Erdélyi Miklós (2014) Functional analysis of the Drosophila embryonic germ cell transcriptome by RNA interference. PloS One 9: e98579.
IF: 3,730

Egyéb közlemények:

Vilmos Péter, Bujna Ágnes, Szuperák Milán, Havelda Zoltán, Várallyay Éva, Szabad János, Kucerova Lucie, Somogyi Kálmán, Kristó Ildikó, Lukácsovich Tamás, Jankovics Ferenc, Henn László, Erdélyi Miklós (2013) Viability, longevity, and egg production of Drosophila melanogaster are regulated by the miR-282 microRNA. Genetics 195: 469–480.
IF: 4,389

Jankovics Ferenc, Henn László, Bujna Ágnes, Vilmos Péter, Kiss Nóra, Erdélyi Miklós (2011) A functional genomic screen combined with time-lapse microscopy uncovers a novel set of genes involved in dorsal closure of Drosophila embryos. PloS One 6: e22229.
IF: 4,092

Ádám Csaba, Henn László, Miskei Márton, Erdélyi Miklós, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor (2010) Conservation of male-specific expression of novel phosphoprotein phosphatases in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 220: 123–128.

IF: 2,008

Vilmos Péter, Jankovics Ferenc, Szathmári Margit, Lukácsovich Tamás, Henn László, Erdélyi Miklós (2009) Live imaging reveals that the *Drosophila* actin-binding ERM protein, moesin, co-localizes with the mitotic spindle. *Eur J Cell Biol* 88: 609–619.

IF: 3,314

Csikós György, Lippai Mónika, Lukácsovich Tamás, Juhász Gábor, Henn László, Erdélyi Miklós, Maróy Péter, Sass Miklós (2009) A novel role for the *Drosophila* epsin (lqf): involvement in autophagy. *Autophagy* 5: 636–648.

IF:6,829

Vilmos Péter, Henn László, Szathmári Margit, Lukácsovich Tamás, Sipos László, Erdélyi Miklós (2007) Application of the dual-tagging gene trap method combined with a novel automatic selection system to identify genes involved in germ cell development in *Drosophila melanogaster*. *Acta Biol Hung* 58 Suppl: 81–94.

IF: 0,447

Összesített IF: 24,809

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban Dr. Erdélyi Miklósnak, aki ösztönző támogatásával, tanácsaival, építő kritikáival és türelemmel segítette e munkámat. Dolgozatom nem születhetett volna meg Dr. Jankovics Ferenc szakmai hozzájárulása nélkül, aki a bemutatott kísérletekben jelentős szerepet vállalt, különösen a gének (*mei-P26*, *pbl*, *feo*) részletes analizisében. Feri felkészültségével, alapos irodalmi és technikai ismereteivel nagyszerűen koordinálta a kísérleteket, ezért hálával tartozom neki. Köszönettel tartozom még Szathmári Margitnak, Velkeyné Krausz Ildikónak, Dr. Vilmos Péternek, Bujna Ágnesnek, Dr. Hegedűs Zoltánnak, akik munkájukkal hozzájárultak a bemutatott eredmények megszületéséhez. Köszönöm nekik, valamint csoportunk egykori és jelenlegi tagjainak, valamint a szegedi *Drosophilás* közösségnek, hogy a rám bízott feladatokat családias, baráti, és nem utolsó sorban jó szakmai légkörben végezhettem. Köszönöm Dr. Török Tibornak és Dr. Honti Viktornek, hogy doktori dolgozatomat kijavították. Hasznos észrevételeiknek és javaslataiknak köszönhetően nyerte el dolgozatom végső formáját.

Végül szeretném megköszönni családom, elsősorban feleségem szerető támogatását és türelmét.